

Avaliação do perfil metabólico de extratos aquosos e hidroalcoólicos de sementes de *Crotalaria* spp.

Rodrigo Wesley Nascimento de Melo¹, Larissa Andreani Carvalho², José Antônio de Aquino Ribeiro³, Clenilson Martins Rodrigues⁴

Resumo

Extratos vegetais são utilizados há milênios em diversas aplicações, entre as quais destacam-se seu uso medicinal, como inseticidas naturais, antifúngicos e antioxidantes dentre outros. Cada vez mais se buscam alternativas naturais ao uso de produtos derivados da indústria química, e para tanto é necessária a prospecção de extratos com metabólitos secundários ativos para estas aplicações. O gênero *Crotalaria* possui em torno de 600 espécies e é encontrado na África, Índia, México e Brasil. Este trabalho buscou avaliar dois métodos de extração dos metabólitos das sementes de *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria breviflora*, *Crotalaria juncea* e *Crotalaria ochroleuca*, e identificar de maneira preditiva, nesses mesmos extratos, os metabólitos secundários que os compõem. Foram investigados dois métodos de extração, em triplicata, para cada biomassa. Um usando meio hidroalcoólico (etanol/água/ácido acético 7,00/2,95/0,05%) e outro usando meio aquoso. Avaliações do perfil cromatográfico foram realizadas por meio de cromatografia de ultra-alta eficiência (UHPLC) com o sistema UPLC *Acquity H-Class* acoplado ao detector de arranjos de fotodiodos (PDA) com varredura na faixa espectral de 200-400 nm. Para todas as biomassas avaliadas a extração em meio aquoso apresentou o maior rendimento, entretanto as extrações em meio hidroalcoólico também apresentaram rendimentos satisfatórios. De acordo com os dados cromatográficos e espectrais dos extratos de *C. Spectabilis* foi atribuída a provável ocorrência de aminoácidos, alcaloides, derivados da fenilalanina, flavonoides, flavonas e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os dados cromatográficos e espectrais dos extratos de *C. breviflora* indicaram a presença de aminoácidos, alcaloides, flavonoides e derivados do ácido hidroxicinâmico. Já nos extratos de *C. Juncea* observou-se dados espectrais que corroboraram com a presença aminoácidos, flavonoides, alcaloides, derivados de fenilalanina e derivados de ácido hidroxicinâmico. Por fim, para os extratos de *C. ochroleuca* observou-se a provável ocorrência de alcaloides, derivados de ácido hidroxicinâmico, flavonas e flavonoides.

Palavras-chave: metabólitos secundários, crotalaria, métodos de extração.

¹ Graduado em Química, Universidade Católica Brasília, rodwesley1995@gmail.com

² Química, doutora em Físico-Química, analista da Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

³ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁴ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

Introdução

Extratos vegetais são utilizados há milênios e nas mais variadas aplicações, entre as quais destacam-se o seu uso medicinal, como inseticidas naturais, antifúngicos e antioxidantes. A utilização em grande escala e de forma indiscriminada de produtos sintéticos, derivados da indústria química, têm ocasionado riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente, sendo notória a busca por seus respectivos substituintes menos nocivos. Assim, há grande interesse na prospecção de substâncias químicas de origem renovável que apresentem atividade farmacológica, antifúngica, inseticida, entre outras.

Crotalaria é um gênero que pertence à família *Fabaceae* e que possui em torno de 600 espécies, podendo ser encontrada na África, Índia, México e Brasil (Scupinari et al., 2020). Essas plantas também apresentam grande produção de biomassa verde e capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico (Gardiano et al., 2010). Tanto as folhas quanto as sementes de *Crotalaria* apresentam alcaloides pirrolizidínicos (APs), sendo a monocrotalina o principal AP encontrado nas plantas desse gênero (Gardiano et al., 2010; Barreto et al., 2006). Esse composto apresenta alta toxicidade a vertebrados e, com isso, acredita-se que produza metabólitos secundários com potencial utilização inseticida em culturas agrícolas (Wang et al., 2002).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a preparação de extratos aquosos e hidroalcoólicos de sementes de *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria breviflora*, *Crotalaria juncea* e *Crotalaria ochroleuca*, visando o alcance do máximo de rendimento de seus extrativos, bem como propor a identificação de classes de metabólitos secundários para viabilizar a estratégia de aplicação desses extratos em estudos futuros.

Material e Métodos

Sementes de *C. spectabilis*, *C. breviflora*, *C. juncea* e *C. ochroleuca* (Sementes Pirai Ltda) foram secas em estufa a 40°C até peso constante. Em seguida, as sementes foram moídas em moinho analítico portátil e tamisadas em agitador eletromagnético utilizando peneiras com tamanho de malha de 850, 425, 300 e 250 µm. Partículas menores que 250 µm também foram coletadas. A fração de 425 µm foi selecionada para os ensaios de extração devido a maior quantidade apresentada de material ao final da tamisação. Em seguida, cada uma das amostras passou por processos de extração em meio aquoso e hidroalcoólico, conforme detalhado a seguir. As atividades envolvendo a *C. breviflora*, por ser espécie nativa, foram registradas no SisGen sob o número A832F15.

Agitação em solução hidroalcoólica

Quantidade conhecida de biomassa (aprox. 10 g) foi mantida sob agitação por 48 h a temperatura ambiente em frasco fechado de 500 mL contendo 215 mL de solução de etanol/água/ácido acético 7,00/2,95/0,05%. Decorridas as 48 h, o conteúdo do frasco foi centrifugado e filtrado à vácuo, o sobrenadante foi reservado e a fração sólida restante foi novamente transferida para frasco fechado na presença de nova alíquota de 215 mL de solução hidroalcoólica, onde permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por mais 24 h. O conteúdo do frasco foi novamente centrifugado e filtrado à vácuo e o sobrenadante desta etapa foi agregado ao sobrenadante anterior. Em seguida,

o sobrenadante final foi rotaevaporado para a retirada do etanol, congelado e liofilizado. A massa resultante do processo de liofilização foi utilizada para a determinação do rendimento da extração. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada biomassa estudada.

Refluxo em solução aquosa

Quantidade conhecida de biomassa (aprox. 10 g) foi adicionada a um balão de fundo redondo de 500 mL. Em seguida, foi adicionada uma barra magnética e 430 mL de água destilada ao balão. Este balão foi acoplado a um condensador e colocado em banho de óleo a 100°C, onde permaneceu sob agitação magnética por 1 h. Após este período, a agitação foi interrompida, o extrato foi centrifugado e o sobrenadante foi filtrado à vácuo. A fração líquida foi congelada, liofilizada e pesada para a determinação do rendimento da extração. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada biomassa estudada.

Análise cromatográfica

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) em um cromatógrafo a líquido UPLC *Acquity H-Class* acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos (PDA) com varredura na faixa espectral de 200-400 nm.

O extrato seco de cada uma das amostras foi preparado na concentração de 30 mg/mL em água:acetonitrila (1:1). Após esse preparo em béquer de 25 mL, todas as amostras ficaram em banho ultrassônico por 15 min e depois foram transferidas para tubos *falcon* onde foram centrifugadas por 10 min a 9000 rpm. Por fim, as amostras preparadas tiveram o sobrenadante filtrado em membrana omipore de PTFE hidrolifílico com 0,22 µm de poro. Alíquotas de 1 µL das amostras foram injetadas nas seguintes condições:

- Coluna *Acquity UPLC HSST3* 1,8 µm, 2,1 x 150 mm;
- Temperatura da coluna: 40°C;
- Modo de eluição: gradiente (Tabela 1);
- Fase móvel - Solvente A: H₂O/0,1% ácido trifluoracético (TFA); Solvente B: Acetonitrila/0,1% TFA.

Tabela 1. Gradiente de eluição empregado na análise por UHPLC-PDA dos compostos químicos presentes nos extratos obtidos.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B
Inicial	0.400	100	0
5.00	0.400	100	0
30.00	0.400	75	25
32.00	0.400	50	50
33.00	0.400	0	100
35.00	0.400	0	100
35.01	0.400	100	0
45.00	0.400	100	0

Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta os rendimentos de extratos brutos obtidos para cada biomassa pelos métodos de extração utilizados.

Tabela 2. Rendimentos para as extrações hidroalcoólica e aquosa das sementes de crotalária obtidos em triplicata.

Biomassa	Rendimento/Agitação hidroalcoólica (%)	Rendimento/Refluxo aquoso (%)
<i>C. spectabilis</i>	21,42 ± 0,45	31,45 ± 0,71
<i>C. breviflora</i>	26,02 ± 0,65	31,16 ± 0,60
<i>C. juncea</i>	21,74 ± 0,25	50,61 ± 0,72
<i>C. ochroleuca</i>	15,47 ± 0,28	31,48 ± 0,86

Os valores de rendimento obtidos demonstram que o processo de extração por refluxo aquoso fornece maior quantidade de extrato bruto para todas as biomassas avaliadas. Porém as extrações realizadas por processo com agitação hidroalcoólica também resultam em rendimento satisfatório.

A identificação da classe de metabólitos secundários encontrados nos extratos aquosos e hidroalcoólicos foi realizada de forma putativa utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) acoplada com detector de arranjo de fotodiodos (PDA) por meio da avaliação dos espectros de UV dos principais picos eluídos nos cromatogramas das amostras e também a partir da correlação de dados publicados na literatura para o gênero *Crotalaria*. De forma geral, foi possível verificar a presença de alcaloides (que têm sido relacionados aos efeitos tóxicos para fitonematoides), flavonoides (que possuem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias), derivados do ácido hidroxicinâmico (com atividade antioxidante) e aminoácidos que contêm grupos cromóforos em sua estrutura.

A Figura 1 apresenta os cromatogramas em 254 nm para os extratos brutos de sementes de *C. spectabilis*. Os picos eluídos em $t_R = 1,638$ min (para agitação hidroalcoólica, Fig. 1A) e $t_R = 1,634$ min (para refluxo aquoso, Fig. 1B) foram atribuídos à presença de aminoácidos contendo grupamentos cromóforos, que absorvem na região do UV apresentando uma banda intensa em 263 nm seguida de um ombro. Espectros com uma banda intensa na região de 259 nm, indicando a presença de alcaloides, foram identificados em $t_R = 1,708$ e $1,693$ min para os extratos hidroalcoólico e aquoso, respectivamente. Picos eluídos entre $t_R = 9,330$ e $9,620$ min apresentam espectros de UV indicativos de substâncias contendo fenilalanina (banda de intensidade média em 257 nm) e guanosina (máximo de absorção em 255 nm com ombro em 280 nm). Os picos relacionados à presença de flavonoide ($t_R = 21,876$ min), flavona ($t_R = 24,188$ min) e derivados do ácido hidroxicinâmico (tempos de retenção em $t_R = 24,357$, $25,227$ e $26,129$ min) foram facilmente identificados no cromatograma do extrato bruto obtido via agitação hidroalcoólica. Para o extrato bruto aquoso estes picos de eluição ou não estavam presentes, ou apresentaram baixa intensidade.

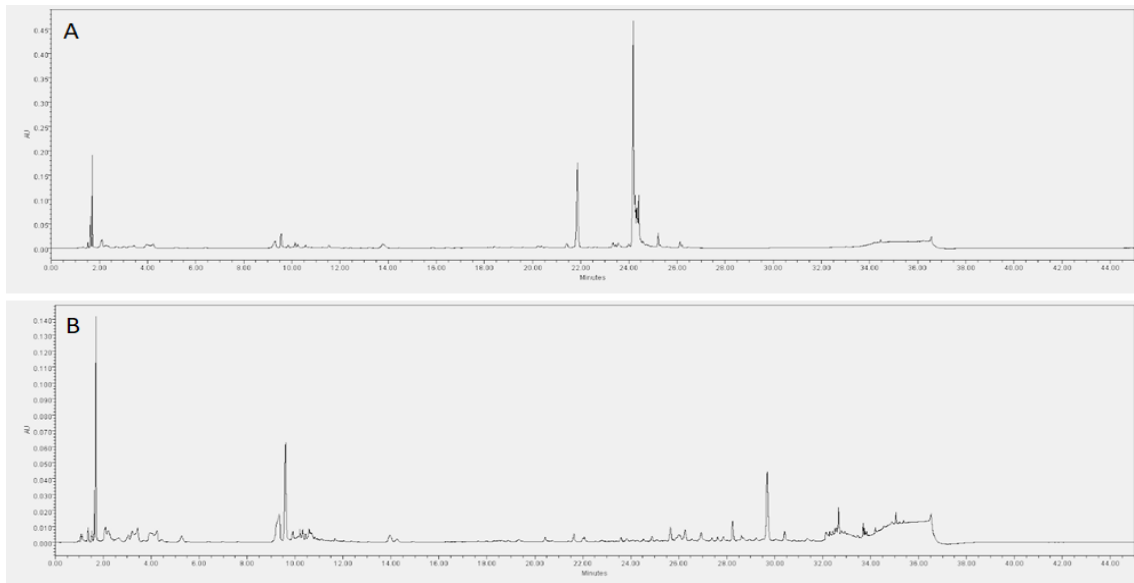


Figura 1. Perfis cromatográficos dos extratos brutos de *C. spectabilis* obtidos pelo processo de agitação hidroalcoólica (A) e refluxo aquoso (B) processados em 254 nm.

Os cromatogramas em 254 nm para os extratos brutos de sementes de *C. breviflora* estão apresentados na Figura 2. Os picos eluídos em $t_R = 1,638$ min (para agitação hidroalcoólica, Fig. 2A) e $t_R = 1,634$ min (para refluxo aquoso, Fig. 2B), a exemplo do exposto para os extratos de *C. spectabilis*, foram atribuídos à presença de aminoácidos. A presença de compostos com absorção UV indicativa de alcaloides foi identificada em $t_R = 1,709$ e 1,697 min para os extratos hidroalcoólico e aquoso, respectivamente. Os picos eluídos em $t_R = 19,080$ min (agitação hidroalcoólica) e $t_R = 19,172$ min (refluxo aquoso) apresentam espectro de UV compatível com o espectro de flavonoides, com máximos de absorção em 257 e 353 nm. Derivados do ácido hidroxicinâmico, com uma banda de máximo de absorção intensa em 288 nm e um ombro em 230 nm, eluíram em $t_R = 19,260$ min, 26,753-26,835 min, 27,651 min e 31,198-31,206 min, tanto para o extrato bruto hidroalcoólico quanto para o aquoso.

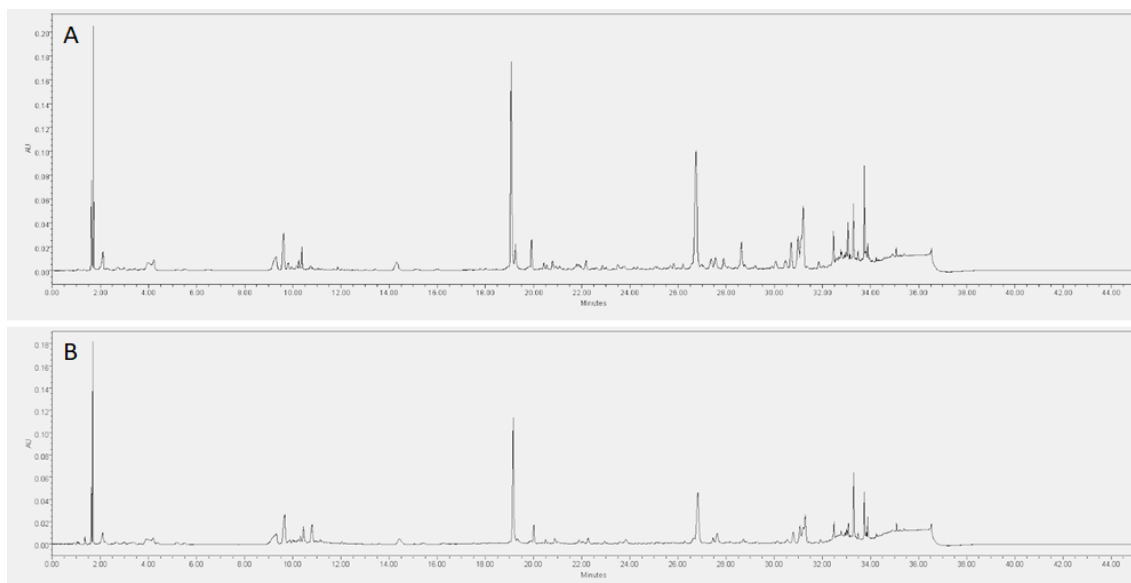


Figura 2. Perfis cromatográficos dos extratos brutos de *C. breviflora* obtidos pelo processo de agitação hidroalcoólica (A) e refluxo aquoso (B) processados em 254 nm.

A Figura 3 apresenta os cromatogramas em 254 nm para os extratos brutos de sementes de *C. juncea*. Novamente, foram observados picos com espectro de absorção UV compatível com a presença de aminoácidos (em $t_R = 1,638$ min para o extrato hidroalcoólico e $t_R = 1,639$ min para o extrato aquoso). O extrato bruto aquoso (Fig. 3B) apresentou um pico eluído em $t_R = 1,686$ min com espectro UV indicativo de alcaloide, enquanto o extrato bruto hidroalcoólico (Fig. 3A) possui um pico em $t_R = 1,703$ com espectro de UV típico de substâncias contendo fenilalanina. Demais picos relacionados à presença de substâncias contendo fenilalanina foram observados em 9,330-9,342 min. O nucleotídeo guanosina também foi identificado em picos eluídos em $t_R = 9,620$ min. Picos relacionados à presença de flavonoide (tempos de retenção em 19,073 e 19,632 min) foram identificados nos cromatogramas dos dois extratos brutos, bem como a presença de um aminoácido eluído em 20,640 min. Por fim, o extrato bruto hidroalcoólico apresenta ainda a indicação da presença de derivados de ácido hidroxicinâmico em $t_R = 26,909$ min e $t_R = 30,545$ min. Estes picos não foram observados para o extrato bruto aquoso.

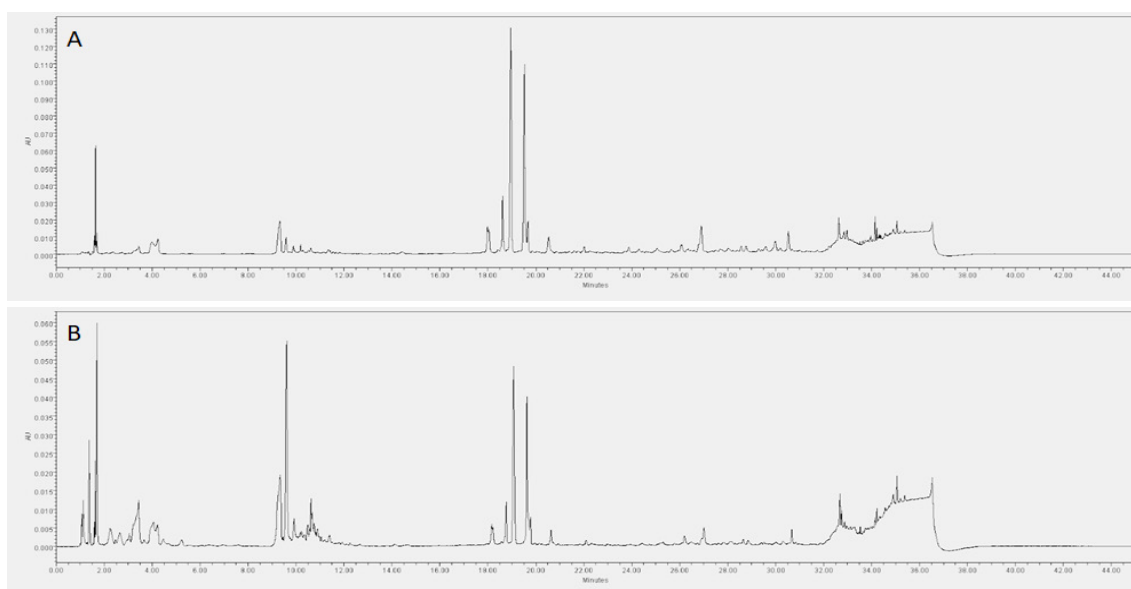


Figura 3. Perfis cromatográficos dos extratos brutos de *C. juncea* obtidos pelo processo de agitação hidroalcoólica (A) e refluxo aquoso (B) processados em 254 nm.

Por fim, os cromatogramas em 254 nm para os extratos brutos de sementes de *C. ochroleuca* estão apresentados na Figura 4. Em comparação com os extratos brutos das demais sementes de crotalária, os extratos da variedade *ochroleuca* apresentaram uma maior quantidade de picos eluídos e maior presença de alcaloides. Espectros de UV compatíveis com a presença de alcaloides foram observados para picos nos tempos de retenção de 1,805, 2,307, 7,965 e 10,206 minutos para o extrato bruto hidroalcoólico (Fig. 4A) e em 1,075, 1,693, 1,780 e 2,299 minutos para o extrato bruto aquoso (Fig. 4B). O extrato bruto obtido a partir de refluxo aquoso ainda apresentou picos indicativos da presença de substância como a fenilalanina ($t_R = 9,307$ e $10,192$ min) e do nucleotídeo guanosina ($t_R = 9,619$ min). Diversos picos, para ambos os extratos, puderam ser correlacionados com a presença de derivados do ácido hidroxicinâmico, nos seguintes tempos de retenção: 20,333, 28,107 e 30,767 min para o extrato hidroalcoólico; 19,339,

20,427 e 28,202 min para o extrato aquoso. Finalmente, espectros de UV indicativos da presença de flavonas e flavonoides foram observados para os picos eluídos em 22,785, 25,371, 27,258, 29,277 e 32,732 min (para o extrato hidroalcoólico) e em 7,957, 22,873, 27,350 e 29,362 min (para o extrato aquoso).

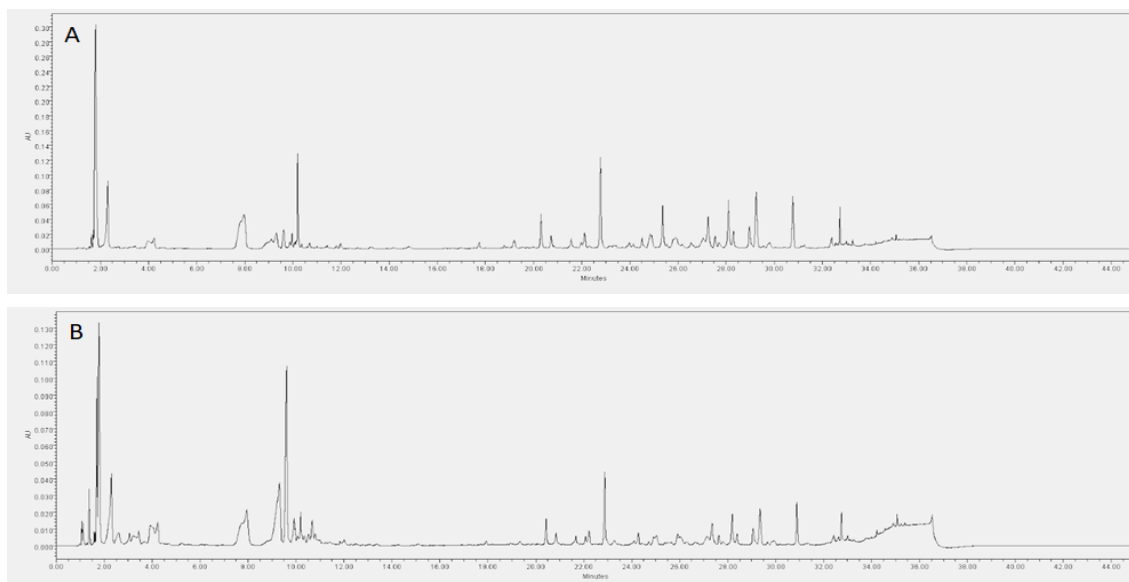


Figura 4. Perfis cromatográficos dos extratos brutos de *C. ochroleuca* obtidos pelo processo de agitação hidroalcoólica (A) e refluxo aquoso (B) processados em 254 nm.

Conclusão

Dentre os perfis comparativos obtidos para os dois modelos de extração, apenas os perfis de *C. spectabilis* demonstraram diferença significativa entre a composição química apresentada nos cromatogramas dos extratos de agitação hidroalcoólica e refluxo aquoso. A partir dos dados cromatográficos e espectrais dos extratos de *C. spectabilis* foi atribuída a provável ocorrência de aminoácidos, alcaloides e derivados da fenilalanina. Porém, a presença de flavonoides, flavonas e derivados do ácido hidroxicinâmico foram observados apenas nos extratos hidroalcoólicos. Os dados cromatográficos e espectrais referentes aos extratos hidroalcoólico e aquoso de *C. breviflora* indicaram a presença de aminoácidos, alcaloides, flavonoides e derivados do ácido hidroxicinâmico. Tanto os extratos hidroalcoólico e aquoso de *C. juncea* também apresentaram dados cromatográficos e espectrais que apontaram a ocorrência de aminoácidos e flavonoides. Já no extrato hidroalcoólico de *C. juncea* observou-se de forma mais acentuada a ocorrência de alguns aminoácidos, provavelmente derivados da fenilalanina, além de derivados do ácido hidroxicinâmico. Além disso, a ocorrência de alcaloides foi notada apenas em seu extrato aquoso. Por fim, para os extratos hidroalcoólico e aquoso de *C. ochroleuca* observou-se maior número de picos cromatográficos separados ao longo da análise, sendo estes associados a uma maior ocorrência de alcaloides. Quando comparada as demais espécies, *C. ochroleuca* também apresentou indícios da presença de derivados do ácido hidroxicinâmico, flavonas e flavonoides.

Referências

BARRETO, R. A.; HUGHES, J. B.; SOUZA, C. S.; SILVA, V. D. A.; SILVA, A. R.; VELOZO, E. S.; BATATINHA, M. J. M.; COSTA, M. F. D.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, S. L. O alcalóide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 112-127, 2006.

GARDIANO, Cristiane Gonçalves; DALLEMOLE-GIARETTA, Rosangela; LOPES, Everaldo Antônio; ZOOCA, Ronaldo João Falcão; FERRAZ, Silamar; FREITAS, Leandro Grassi de. Atividade nematocida de extratos de sementes de espécies de *Crotalaria* sobre *Meloidogyne javanica*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 3-7, 2010.

SCUPINARI, Tamires; RUSSO, Helena Mannocho; FERRARI, Anna Beatriz Sabino; BOLZANI, Vanderlan da Silva; DIAS, Waldir Pereira; NUNES, Estela de Oliveira; HOFFMANN-CAMPO, Clara Beatriz; ZERAIK, Maria Luiza. *Crotalaria spectabilis* as a source of pyrrolizidine alkaloids and phenolic compounds: HPLC-MS/MS dereplication and monocrotaline quantification of seed and leaf extracts. **Phytochemical Analysis**, p. 1-9, 2020.

WANG, Koon-Hui; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review. **Nematropica**, v. 32, n. 1, p. 35-58, 2002.